

# TP BIOLOGIE DE SYNTHÈSE

## 3BB 2020

# Objectifs du TP

- Mettre en œuvre la démarche expérimentale pour contrôler la qualité d'un plasmide contenant une construction ADN d'intérêt commandé à un prestataire.
- Réaliser la bioamplification de l'ADN réceptionné. Analyser in silico les données de séquençage ADN fournies par le prestataire.
- Réaliser la tenue d'un cahier de laboratoire.
- Lors de ces travaux pratiques, votre mission sera de comparer l'option synthétique (conception in silico de la construction ADN et appel à un prestataire pour la synthétiser) à l'option « wet lab » (amplification PCR et clonage en laboratoire du produit PCR) en terme d'efficacité, pénibilité et coût.

# Evaluation

- Deux logigrammes (CAO + clonage « Wetlab ») + 1 conclusion sur le mérite comparé des deux méthodes
- Evaluation sur la tenue du cahier de laboratoire (rendu: un jour au choix)

<https://www.inpi.fr/fr/proteger-vos-creations/le-cahier-de-laboratoire/le-cahier-de-laboratoire>



## En pratique

Tous ceux qui réalisent des travaux de recherche, que ce soit au sein d'un laboratoire ou dans une PME peuvent l'utiliser : chercheurs, ingénieurs, techniciens, thésards, stagiaires...

Concrètement, c'est un cahier sur lequel sont consignés les travaux, au jour le jour. Chaque cahier possède un numéro unique. Y figurent également le nom de l'utilisateur, le nom du propriétaire et un espace en bas de chaque page (numérotée) pour dater et signer.

Par le formalisme qu'il impose (numérotation des pages, notations à l'encre indélébile, etc.), il permet, entre autres, d'assurer la traçabilité des connaissances, d'estimer précisément les contributions scientifiques et techniques de chacun dans le cadre de partenariats, ou encore d'évaluer l'opportunité d'une protection des résultats par un dépôt de brevet...

# UN but, deux tactiques

## Tactique 1

CAO  
Synthèse par prestataire

## Tactique 2

Clonage SLIC (« wetlab »)

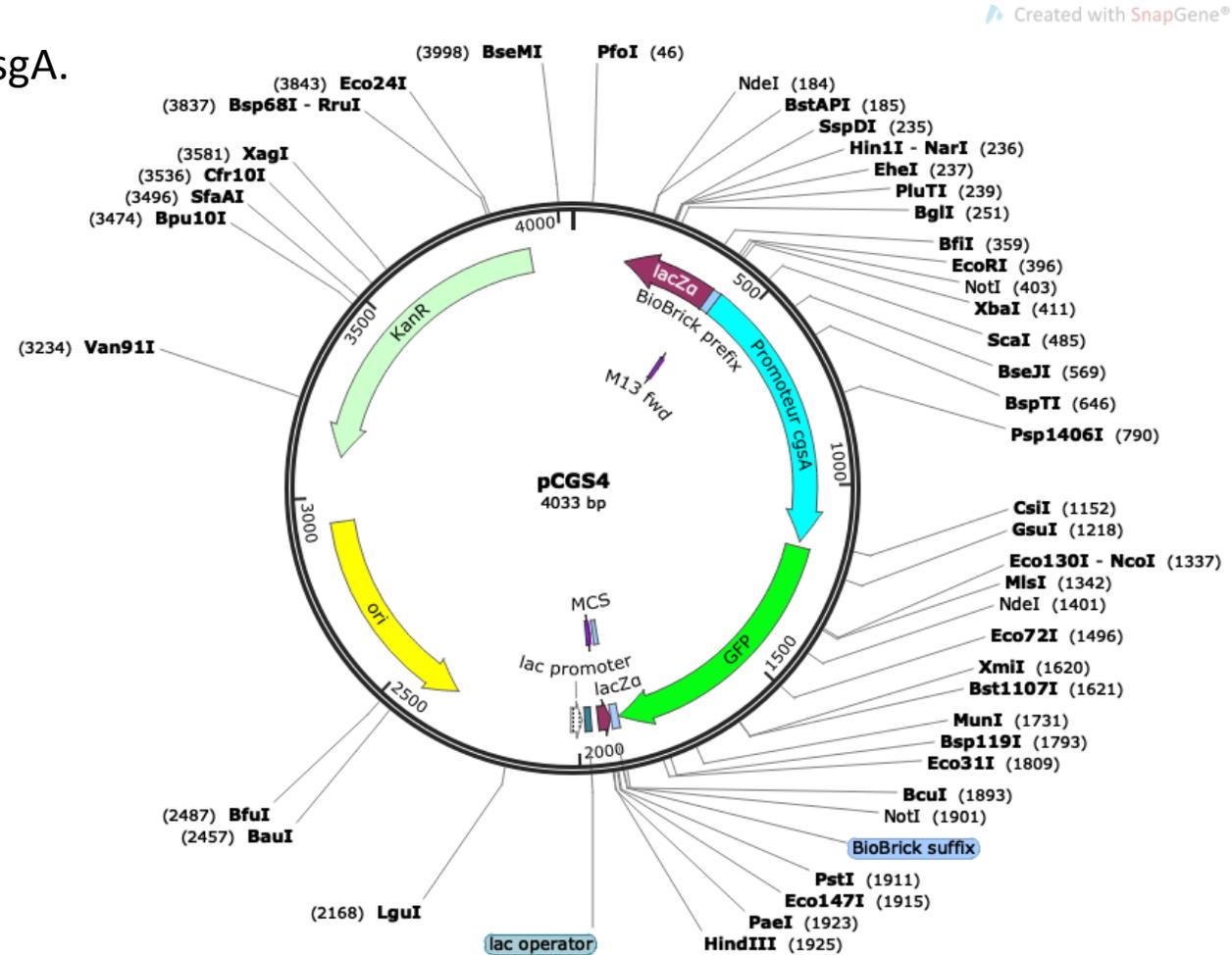
Introduire le promoteur curli devant la séquence codante de la GFP contenu dans le plasmide pIG57

# CAO -> Genecust

- prefix igem (EcoRI XbaI)
- région intergénique csgD-csg orientée pour transcription csgA. Modification du RBS (CCAGGGT -> AGGAGGT).
- GFP BBa\_E0040
- suffix igem (SpeI PstI)
- clonage EcoRI/PstI dans pUC57-kan



## Réception plasmide pSGS4



# Réception plasmide pSGS4 (2x4μg)

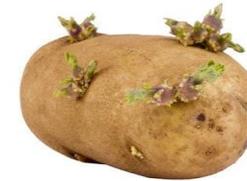
## 1. Contrôle qualité = carte de restriction EcoRI/PstI

Carte attendue\* vs carte observée

*\*Calculer la taille des produits de digestion EcoRI/PstI*

Digestions enzymatiques de contrôle +  
contrôles simples digestions.

## 2. Bioamplification



Mise en culture des souches pour la transformation

Préparation des cellules compétentes, transformation

# JOUR 1

## 8h-12h

- Topo introductif,
- Principe de la transformation des bactéries : phases de la croissance, compétence chimique vs électrocompétence, sélection des transformants
- Contrôle qualité du processus de transformation : notion de témoins (positif et négatif)
- Préparer la manipulation : établir un logigramme, liste du matériel et des appareils nécessaires, localisation et disponibilité
- Tenir son cahier de laboratoire : quelles informations ?
- Mise en culture des souches n°1 (MC4100 *ompR234*) et n°2 (NM522) pour la transformation

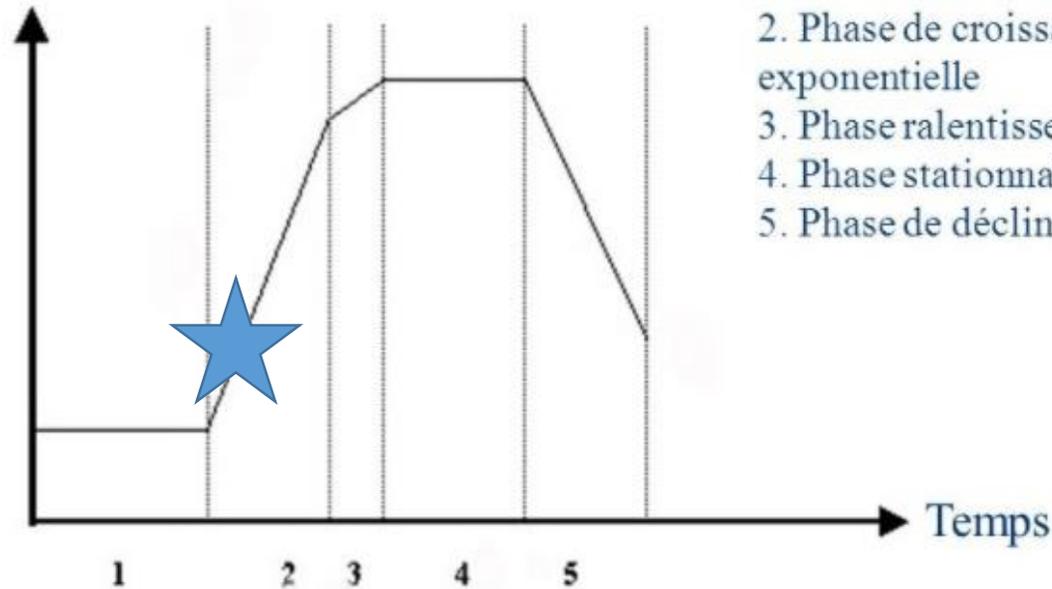
- Principe de la transformation des bactéries : phases de la croissance, compétence chimique vs électrocompétence, sélection des transformants

# TRANSFORMATION

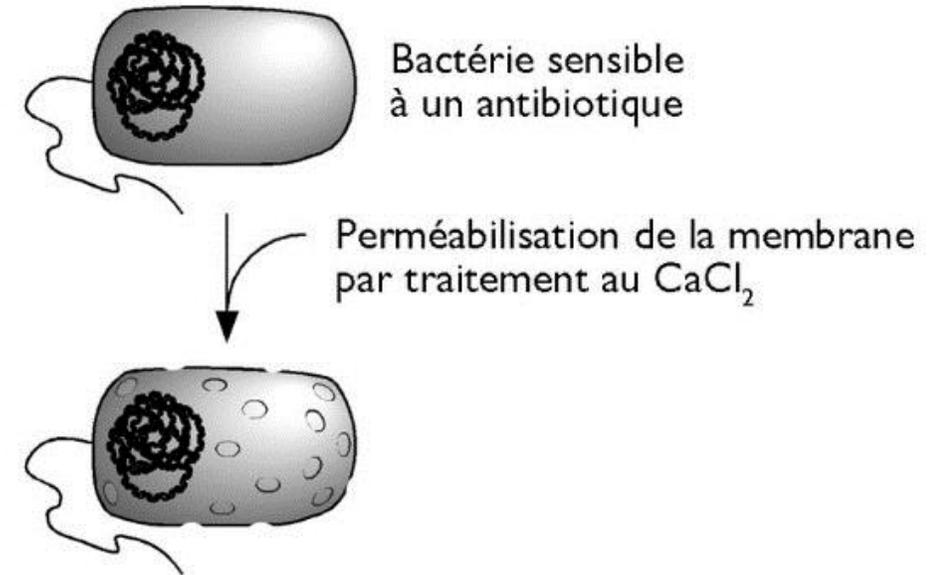
transfert génétique au cours duquel **un fragment d'ADN bicaténaire, libre, nu** et en **solution** est **capté** par une **bactérie réceptrice compétente**

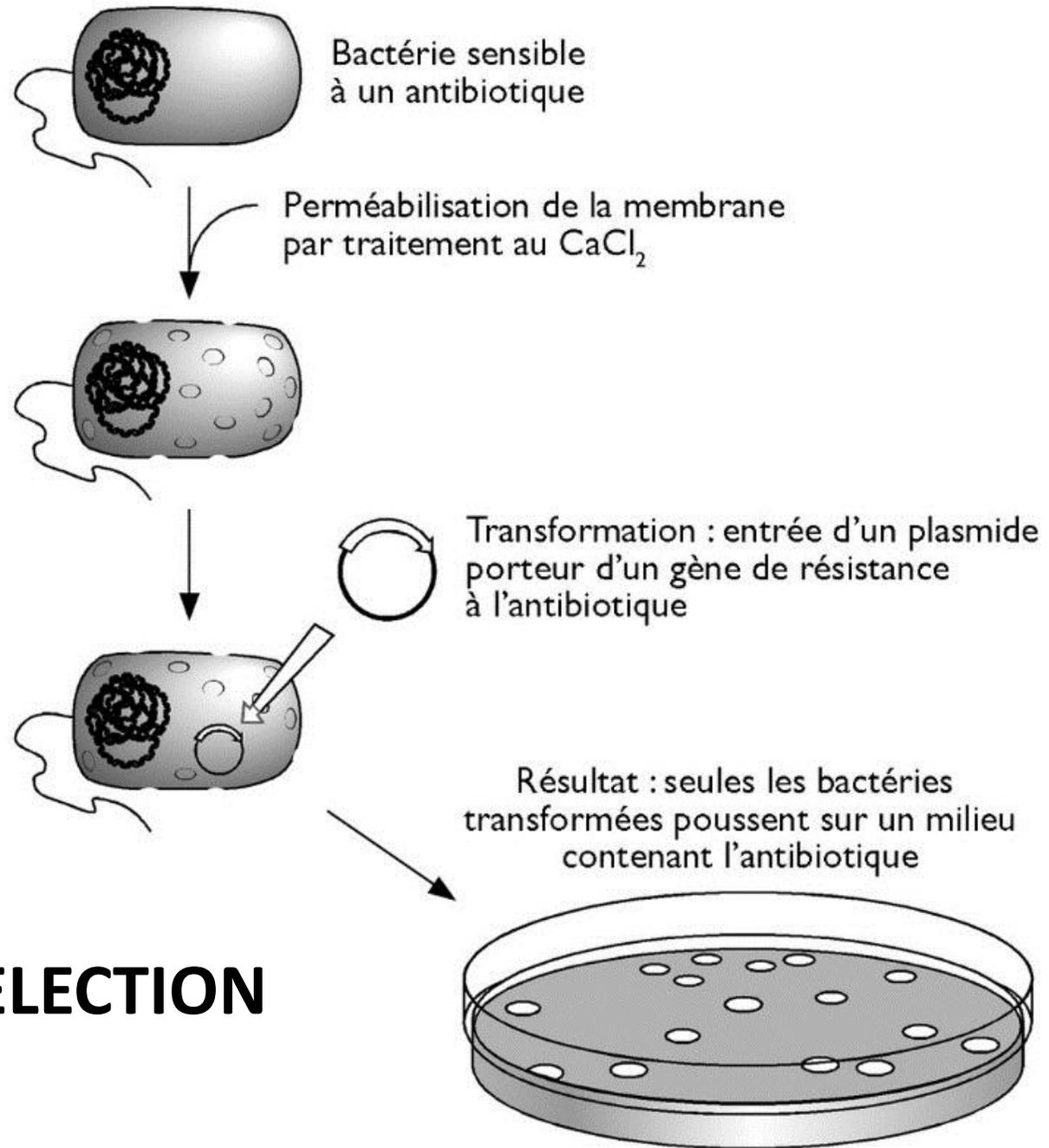
- Principe de la transformation des bactéries : phases de la croissance, compétence chimique vs électrocompétence, sélection des transformants

Nombre de bactéries



1. Phase de latence
2. Phase de croissance exponentielle
3. Phase ralentissement
4. Phase stationnaire
5. Phase de déclin





## SELECTION

- Contrôle qualité du processus de transformation : notion de témoins (positif et négatif)

Contrôle négatif : SANS ADN

Contrôle positif : ADN superenroulé de concentration connue

## **Préparer la manipulation :**

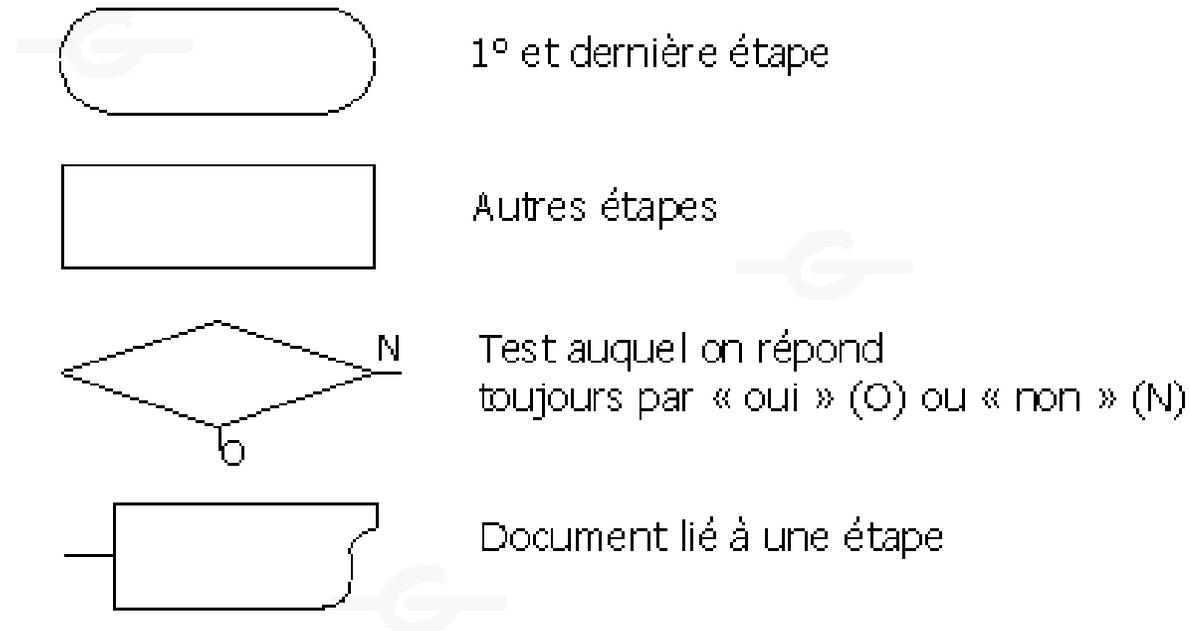
- 1) établir un logigramme
- 2) liste du matériel, milieux et appareils nécessaires,
- 3) localisation et disponibilité

# Logigramme

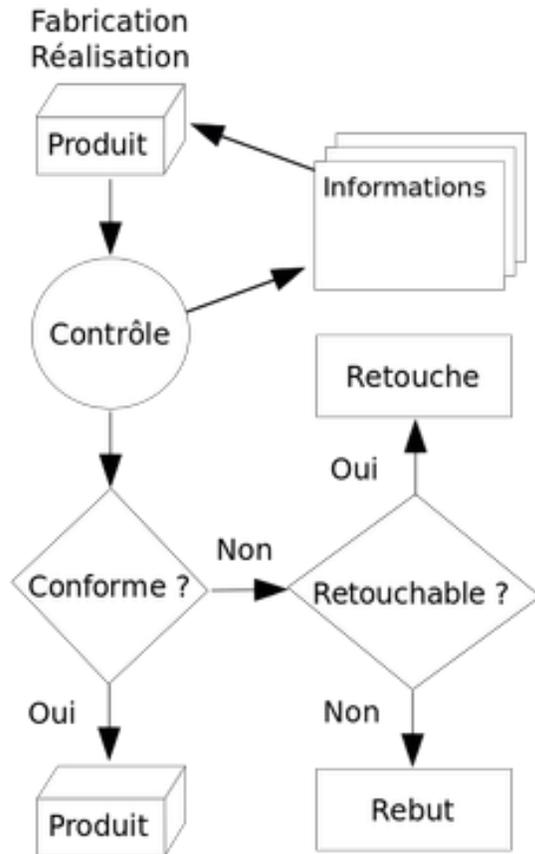
## Objectif

Décrire de façon détaillé un processus, en le découpant en étapes= visualisation d'une activité, fragmentée en tâches élémentaires. Cet outil s'utilise pour décrire une activité de façon complète. Il est notamment utilisé pour la rédaction des procédures.

- Construire le logigramme dans l'ordre chronologique des tâches.
- Plusieurs tâches se déroulant en parallèle sont placées côte à côte.



# Différentes profondeurs, pour commencer établir le logigramme pour la transformation



## Préparation de cellules compétentes et transformation

### Principe

En 1970, Mandel et Higa ont observé que des bactéries traitées avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  froid puis soumises à un bref choc thermique à  $42^\circ\text{C}$  sont dans un état de compétence transitoire qui leur permet "d'ingérer" de l'ADN étranger (phage, plasmide...). Le protocole original permet d'obtenir  $10^6$  colonies transformées par  $\mu\text{g}$  d'ADN de plasmide supercoché. Ce rendement a été amélioré jusqu'à  $10^8$ - $10^9$  colonies/ug en soustrayant des souches sensibles d'*E. coli* à des cocktails de cations divalents, au DMSO et au chlorure d'hexamine cobalt. Le mode d'action de ces agents, tout comme le mécanisme de pénétration de l'ADN du plasmide dans la bactérie compétente reste mal compris. Quoi qu'il en soit, le traitement au  $\text{CaCl}_2$  affecte seulement l'attachement de l'ADN à la paroi cellulaire. L'entrée de l'ADN dans le cytoplasme est stimulée lors du choc thermique à  $42^\circ\text{C}$  qui fluidifie la membrane cytoplasmique.

*E. coli* K12 est la souche-hôte la plus utilisée pour le clonage d'ADN. On utilise fréquemment des mutants *endA* (condamnant à l'inactivation de la principale déoxyribonucléase) qui permettent d'obtenir des préparations de plasmides de meilleures qualités.

### Préparation de bactéries compétentes

- Amener une culture bactérienne fraîchement inoculée à la  $\text{DO}_{600} = 0,3$  par une incubation à  $37^\circ\text{C}$  sous forte agitation
- Prélever 1ml de cette culture en début de phase exponentielle dans un tube Eppendorf stérile. Centrifuger 2 min à 8000 rpm.
- Éliminer complètement le surnageant et resuspendre délicatement les cellules dans 0,1ml de TSS 39:GD. Utiliser dans les quelques heures qui suivent.

### Transformation [0] (Faites un contrôle négatif (sans ADN) et positif (avec 100 ng d'un ADN connu)]

- ajouter l'ADN (plasmide, mélange de ligation) à 0,1 ml de bactéries compétentes
- incubé 10 min dans la glace
- **Realiser un choc thermique en plaçant le tube à  $42^\circ\text{C}$  pendant 50 secondes, replacer sur la glace**
- ajouter 0,9 ml de BL.
- incubé 1h à  $37^\circ\text{C}$
- Étaler 0,1 ml sur milieu sélectif (GL + Antibiotique + Xgal + IPTG si nécessaire)
- Centrifuger le résidu, 2 min à 12000 rpm – Éliminer le surnageant – Reprendre le culot dans 150  $\mu\text{l}$  de BL.

### Étaler sur milieux sélectif

- Incuber les boîtes 1 nuit à  $37^\circ\text{C}$
- rendement attendu:  $10^5$  à  $10^6$  CFU/ $\mu\text{g}$  d'ADN

### TSS (Transformation Storage Solution):

	pour 10 ml
PEG 3350 10%	1 g
$\text{MgCl}_2$ 10 mM	0,1 ml de 1M
$\text{MgSO}_4$ 10 mM	0,1 ml de 1M
DMSO 5%	0,5 ml
IBC 0,1N	environ 150 $\mu\text{l}$ pour un pH de 6,3*
BL	up 10 ml

\* Facultatif. Un ajustement à pH 6,3 permet d'optimiser le rendement de transformation mais n'est pas primordial.

# Se repérer dans les informations fournies

12. Incubate the cells at 37°C for 1 hr.
13. Plate the cells on agar plates containing suitable antibiotics (eg, 100 µg/ml ampicillin).  
We usually spread 10 to 20 µl of the cells onto an agar plate to get optimal number of colonies per plate for single fragment cloning, and 100 µl per plate for multiple fragments cloning. In case of 10-20 µl spreading, cells needs to be further diluted with 80-90 µl LB broth for suitable spreading.
14. Incubate the plates at 37°C for 16 hr and analyze the colonies.

## Mise en culture de bactéries (solide à liquide), suivi de croissance

Les bactéries fournies sur boîte de Petri sont mise en culture liquide en conditions de manipulation stérile en présence d'un bec Bunsen. Le milieu de culture retenu est le milieu de culture LB (Pour lysogeny broth) est le milieu standard pour la culture d'*Escherichia coli* (10g de peptone, 5 g d'extrait de levures, 10 g de NaCl/L).

La croissance bactérienne peut être estimée à partir de la mesure de la densité optique effectuée à 600 nm.

## Préparation de cellules compétentes et transformation

### Principe

En 1970, Mandel et Higa ont observé que des bactéries traitées avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  froid puis soumises à un bref choc thermique à 42°C vont dans un état de compétence transitoire qui leur permet "d'ingérer" du l'ADN étranger (phage, plasmide...). Le protocole original permet d'obtenir  $10^5$ - $10^7$  colonies transformées par µg d'ADN de plasmide superhélicaté. Ce rendement a été amélioré jusqu'à  $10^8$ - $10^9$  colonies/µg en soustrayant des traces amoniacales d'*E.coli* à des cocktails de cations divalents, au DMSO et au chlorure d'hexamine cobalt. Le mode d'action de ces agents, tout comme le mécanisme de pénétration de l'ADN du plasmide dans la bactérie compétente restent mal compris. Quoi qu'il en soit, le traitement au  $\text{CaCl}_2$  affecte seulement l'attachement de l'ADN à la paroi cellulaire. L'entrée de l'ADN dans le cytoplasme est stimulée lors du choc thermique à 42°C qui fluidifie la membrane cytoplasmique.

*E. coli* K12 est la souche-hôte la plus utilisée pour le clonage d'ADN. On utilise fréquemment des mutants *endA* (condensant à l'incision de la principale déoxyribonucléase) qui permettent d'obtenir des préparations de plasmides de meilleures qualités.

### Préparation de bactéries compétentes

- Arrêter une culture bactérienne fraîchement inoculée à la  $\text{DO}_{600} = 0,3$  par une incubation à 37°C sous forte agitation
- Prélever 1ml de cette culture en début de phase exponentielle dans un tube à pipetter stérile. Centrifuger 2 min à 8000 rpm.
- Éliminer complètement le surnageant et resuspendre délicatement les cellules dans 0,1ml de TSS 3900D. Utiliser dans les quelques heures qui suivent.

Transformation [Faites un contrôle négatif (sans ADN) et positif (avec 100 ng d'un ADN connu)]

- ajouter l'ADN (plasmide, mélange de ligations) à 0,1 ml de bactéries compétentes
  - incubé 10 min dans la glace
  - réaliser un choc thermique en plaçant le tube à 42°C pendant 50 secondes, replacer sur la glace
  - ajouter 0,9 ml de BL.
  - incubé 1h à 37°C
  - Étaler 0,1 ml sur milieu sélectif (CE + Antibiotique + Xgal + IPTG si nécessaire)
  - Centrifuger le résidu, 2 min à 12000 rpm – Éliminer le surnageant – Reprendre le culot dans 150 µl de BL.
- Étaler sur milieu sélectif
- Incuber les boîtes 1 nuit à 37°C
  - rendement attendu:  $10^5$  à  $10^6$  CFU/µg d'ADN

### TSS (Transformation Storage Solution):

	pour 10 ml
PEG 3350 10%	1 g
MgCl2 10 mM	0,1 ml de 1M
MgSO4 10 mM	0,1 ml de 1M
DMSO 5%	0,5 ml
HCl 0,1N	environ 150 µl pour un pH de 6,3*
BL	qq 10 ml

\* Facultatif. L'ajoutement à pH 6,3 permet d'optimiser le rendement de transformation mais n'est pas primordial.

# JOUR 1

## 8h-12h

- Topo introductif, visite de la plateforme Microbiologie
- Principe de la transformation des bactéries : phases de la croissance, compétence chimique vs électrocompétence, sélection des transformants
- Contrôle qualité du processus de transformation : notion de témoins (positif et négatif)
- Préparer la manipulation : établir un logigramme, liste du matériel et des appareils nécessaires, localisation et disponibilité
- Tenir son cahier de laboratoire : quelles informations ?
- Mise en culture des souches n°1 (MC4100 *ompR234*) et n°2 (NM522) pour la transformation

# JOUR 1

## 8h-12h

- Topo introductif, visite de la plateforme Microbiologie
- Principe de la transformation des bactéries : phases de la croissance, compétence chimique vs électrocompétence, sélection des transformants
- Contrôle qualité du processus de transformation : notion de témoins (positif et négatif)
- Préparer la manipulation : établir un logigramme, liste du matériel et des appareils nécessaires, localisation et disponibilité
- Tenir son cahier de laboratoire : quelles informations ?
- Mise en culture des souches n°1 (MC4100 *ompR234*) et n°2 (NM522) pour la transformation



**11h45**

- Tenir son cahier de laboratoire : quelles informations ?

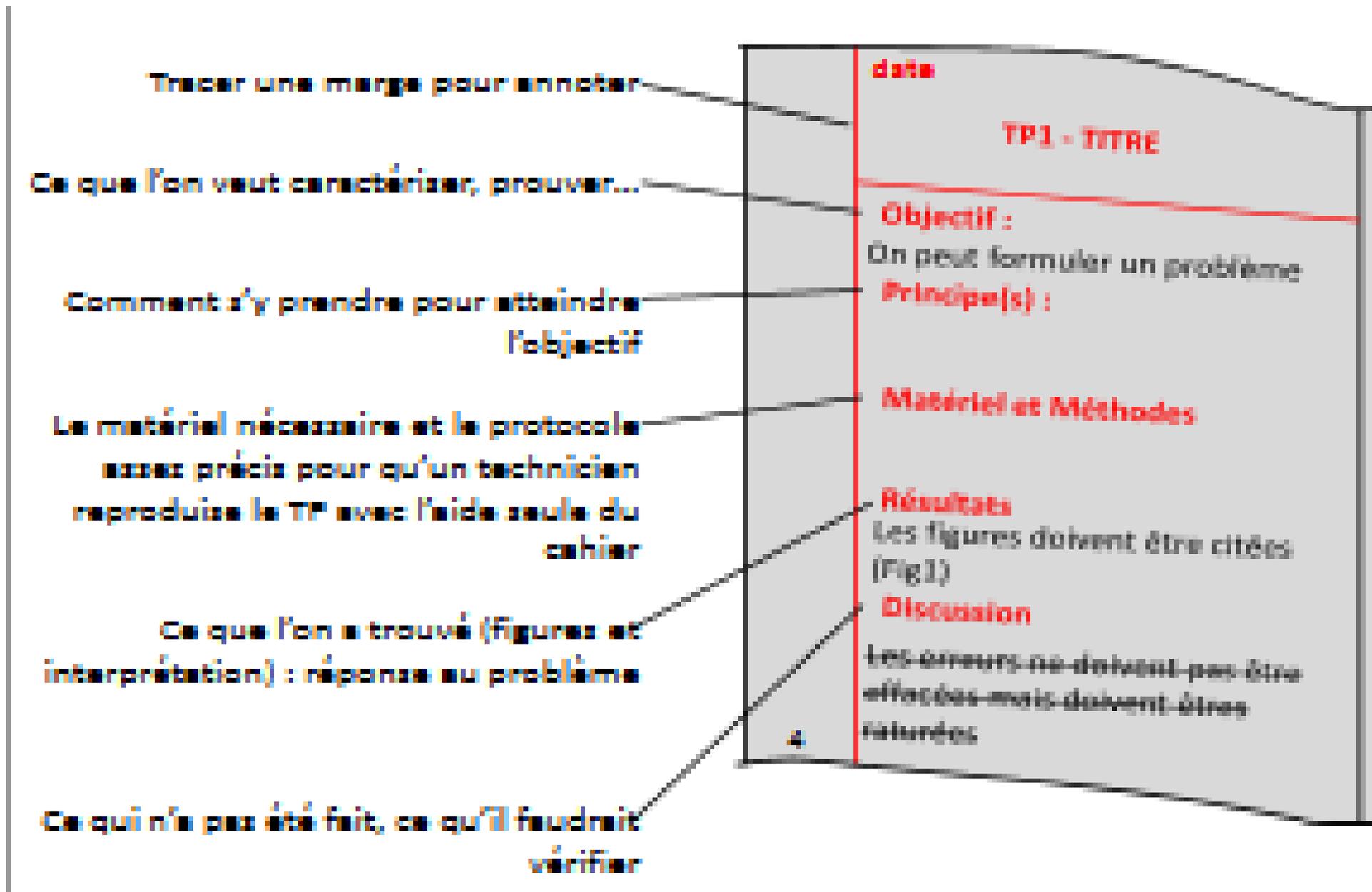
## I- Fiche technique : tenir un cahier de laboratoire

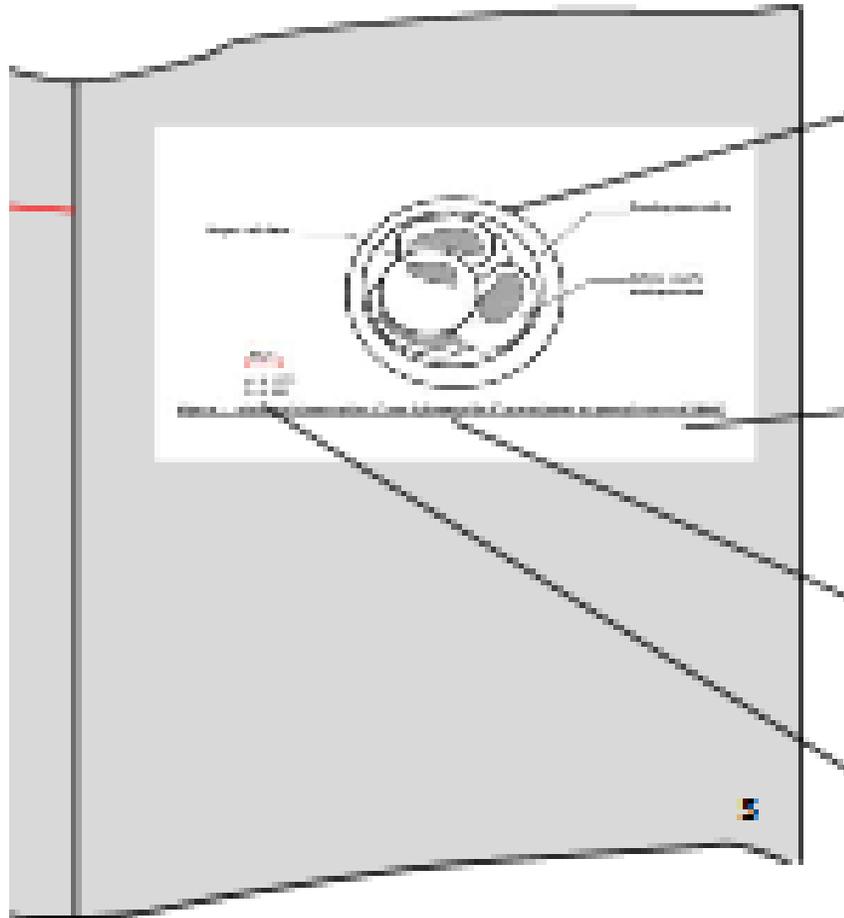
par Antoine Massé

Un cahier de laboratoire *alias* cahier de manipulations *alias* cahier d'expérimentation est une seconde mémoire : il doit contenir toute l'information essentielle à la reproduction des manipulations réalisées.

### Intérêts :

- 1- Valeur juridique – prouver ce qui a été fait ou ce qui n'a pas été fait par l'expérimentateur en cas de conflit judiciaire.
- 2- Valeur documentaire – le cahier de laboratoire d'un technicien appartient à son entreprise : il peut ainsi être confié à un nouveau technicien et doit contenir ainsi toute l'information nécessaire à la reproductibilité des expériences réalisées par l'auteur du cahier.





Figures, photos, capture d'écran, lien vers dossier numérique:  
numérotez et légendez!

## Mise en forme

- 1- Page de garde - avec intitulé du domaine d'exercice (Biologie Cellulaire), du lieu de travail (IUT de Périgueux, département Génie Biologique) - NOM et PRENOM
- 2- Table des matières - sauter deux pages afin de laisser de la place pour la rédiger au fur et à mesure (Titres de chaque TP + numéros de page).
- 3- Marges - à tracer à la règle afin de permettre une annotation
- 4- Collages - aucun support additionnel ne doit être volant ou attaché par un trombone : il faut l'agrafer ou le coller : ne jamais laisser une feuille collée se rabattre sur un autre contenu.
- 5- Numérotation - Numérotter TOUTES les pages (et faire référence à ces numéros dans la table des matières).
- 6- En cas d'erreur - Ne jamais effacer ou arracher une page (un cahier de laboratoire ayant une valeur juridique, on ne doit pas pouvoir soupçonner sa falsification) : les erreurs doivent être raturées à la règle.
- 7- Saut de page : toute page laissée vide entre deux pages rédigées doit être raturée.

## que consigner ?



- ✓ Titre, date de début et fin de l'expérimentation
- ✓ Indication du protocole, du choix de la méthode
- ✓ Calculs et méthodes de traitement des données
- ✓ Références de manips précédentes (n° cahier, pages)
- ✓ Relevés de mesures, valeurs de réglages, conditions opératoires
- ✓ Références des réactifs, des équipements
- ✓ Références et localisation de documents, photos, fichiers, données liées
- ✓ Description du déroulement des manipulations, même si elles n'ont pas abouti (fausses pistes)
- ✓ Liens entre les phases de l'expérimentation
- ✓ Faits et observations marquants ou inhabituels
- ✓ Interprétations et commentaires sur les résultats obtenus
- ✓ Nouvelles hypothèses de travail

**1- Date :** chaque ajout au cahier doit être daté. Dater est particulièrement important dans les laboratoires où le cahier a une valeur juridique.

**2- Titre :** chaque TP doit avoir un titre explicite et être numéroté.

*Remarque :* Ce titre ainsi que le numéro de page doit être ajouté à la table des matières.

**3- Objectifs ou problème :** pour chaque TP, rédiger les objectifs sous le titre. Ils peuvent être formulés sous forme de question.

*Remarque :* On peut avoir pour objectif 1- la pratique de techniques (Ex : colorer des structures cellulaires, 2- la réponse à une question scientifique (Ex : quel est l'effet du sel sur la vacuole ?) ou 3- la vérification d'une hypothèse.

**4- Principe(s) :** le(s) type(s) de méthode(s) utilisée(s). Cf. *Fiche technique : "Avoir une démarche expérimentale"*

*Exemple :* Si on veut caractériser la paroi cellulaire (**Objectif**), il va falloir la colorer (**Principe**) ce qui implique plusieurs étapes de coupe, coloration, nettoyage (**Protocole**).

**5- Matériel et Méthodes :** correspond au protocole : il doit être suffisamment clair et précis pour qu'un simple lecteur du cahier puisse reproduire le TP.

**6- Résultats :** Cette rubrique doit permettre d'annoncer les résultats, d'analyser et commenter les figures en les citant (Ex : Fig2). Dans un deuxième temps, cette rubrique doit obligatoirement donner lieu à une interprétation des résultats afin de remplir les objectifs ou de **répondre au problème**.

**7- Discussion :** Cette rubrique permet de **répondre** à la question posée ou de valider l'hypothèse initiale. **De plus**, elle permet de préciser : ce qui n'a pas fonctionné - les hypothèses pour expliquer les résultats ou ce qui a posé problème - ce que l'on pourrait faire pour aller plus loin - ce que l'on aurait dû faire et qui n'a pas été fait.

Contenu rédigé pour  
chaque TP :

# JOUR 1

14h-18h

- **Préparation des cellules compétentes, transformation**
- Analyse de la séquence ADN fournie par le prestataire. Comparaison de séquences à l'aide du logiciel Serial Cloner pour identifier et vérifier la séquence du plasmide et du gène d'intérêt. Éléments remarquables (gènes de résistances aux antibiotiques, origine de répllication...). Cartographie de restriction. Mettre en œuvre la démarche expérimentale pour le contrôle de la qualité de la séquence d'ADN fournie.
- Température et milieux de stockage de l'ADN (eau, TE)
- Méthodes d'analyse de l'ADN : séparation sur gel d'agarose (paramètres clé : concentration d'agarose, type de tampon, voltage) et préparation des échantillons à déposer (solution de dépôt)
- Paramètres clés dans la digestion de l'ADN (appariement tampon/enzyme, pipetage de solutions visqueuses, température et temps d'incubation)
- **Digestions enzymatiques de contrôle (pCGS4=pUC17-Pcurli-RBS6GFP (KanR) à digérer par EcoI et PstI, analyse des conditions de double digestion, contrôles simples digestions.**
- **Coulage de 2 gels d'agarose à 0,7%**
- Remplir le cahier de laboratoire

- Température et milieux de stockage de l'ADN (eau, TE)
- Méthodes d'analyse de l'ADN : séparation sur gel d'agarose (paramètres clé : concentration d'agarose, type de tampon, voltage) et préparation des échantillons à déposer (solution de dépôt)
- Paramètres clés dans la digestion de l'ADN (appariement tampon/enzyme, pipetage de solutions visqueuses, température et temps d'incubation)

14h-18h

- Préparation des cellules compétentes, transformation
- Digestions enzymatiques de contrôle (pCGS4=pUC17-Pcurli-RBS6GFP (KanR) à digérer par XbaI et PstI, analyse des conditions de double digestion, contrôles simples digestions.
- Remplir le cahier de laboratoire

*Avant de partir:*

- *Logigramme CAO/WET LAB?*
- *Cahier de labo?*

# JOUR 2

## 8h-12h

- **Coulage de 2 gels d'agarose à 0,7%**
- **Migration des plasmides digérés et non digérés sur gel d'agarose**
- Prise en main du système d'imagerie et d'analyse Chemidoc : marqueurs de taille, estimation de la taille des fragments de restriction, quantification de la quantité d'ADN.
- **Révélation de l'ADN grâce au bromure d'ethidium. Lecture au Chemidoc**
- Analyse du gel (ADN superenroulé, cercle ouvert vs linéaire, nombre de fragments = nombre de site de restriction)

Logiciel pour analyser les images obtenues sur Chemidoc à télécharger ici:

<http://www.bio-rad.com/fr-fr/product/image-lab-software>

# JOUR 2

## 14h-18h

- Principe de la PCR
- Contrôle de la qualité de la PCR : notion de témoin positif et négatif
- Optimisation de la réaction de PCR : rôle du  $MgCl_2$ , température d'hybridation, ratio matrice/amorces
- Conception (design) des amorces
- Réaction de PCR sur ADN génomique (MC4100 1 $\mu$ L) ou p50 (ApR 1 $\mu$ L), contrôles
- Mise en culture des transformants issus de la transformation effectuée à J1. Notion de collections.
- Remplir le cahier de laboratoire

# Conception (design) des amorces

Les amorces sont de courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN monocaténaire, utilisées lors des PCR pour borner l'amplicon. Elles sont spécifiques de la séquence à amplifier, stables et compatibles entre elles.

- **Spécificité**

- taille : 15 à 30 nt
- contenu en GC : 40 à 60%
- séquence spécifique à la zone d'intérêt et site unique d'hybridation
- $T_m$  compris entre 45 et 70°C

- **Stabilité**

- faible formation de dimères et de structures secondaires
- extrémité 3' : présence de quelques bases GC en 3' (point de départ de la polymérisation), même chose pour l'extrémité 5' (fixation de l'amorce)

- **Compatibilité**

- Différence  $T_m < 4^\circ\text{C}$

N°	Nom de l'Oligo	Séquence (5'->3')	Qté [OD]	Qté [µg]	Qté [nmol]	Concentration [pmol/µl]	Vol. pour 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	Taux de GC	Echelle de Synthèse
1	Prom curli sens	ctaaggatgatttctggaattcGAT GAAACCCCGCTTTTTTA TTG (46)	18.5	523	37,0	-	370	70,3	14135	37 %	0.05 µmol
2	Prom curli rev	ctagTAttctcctctttCTCTAGA GTTGTCACCCTGGACCT GGTCG (47)	24.3	742	51,9	-	519	> 75	14304	48,9 %	0.05 µmol

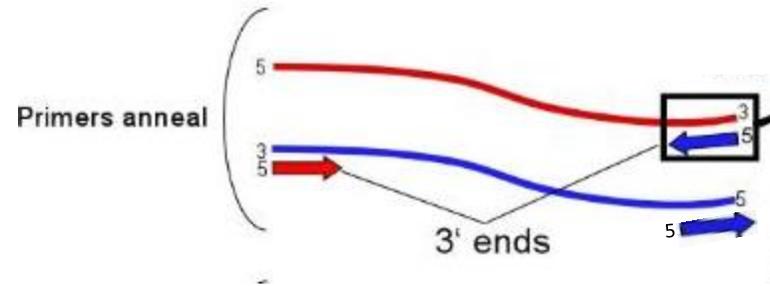
- **Aligner grâce à Serial Cloner:**

- 1) Prom curli sens et pIG57
- 2) Prom curli sens et Prom curli csgA
- 3) Prom curli rev et pIG57
- 4) Prom curli rev et Prom curli csgA

- **Repérer (= souligner) sur la séquence de Prom curli csgA p18 du poly les séquences homologues**

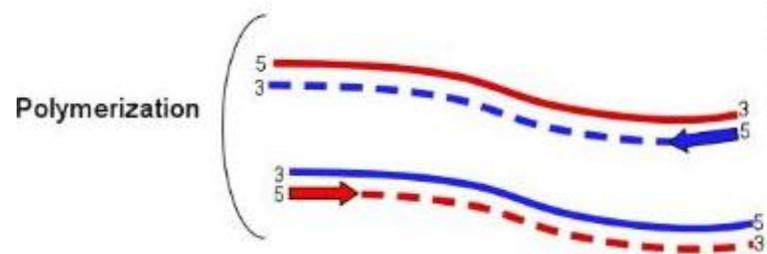
- **Calculer le Tm**

Tm = Temperature of melting ou température de fusion = Température à laquelle la moitié des hybrides formés sont dissociés



5 → **5'-CGACCAGGTCCAGGGTGACAAC-3'** *Allongement à l'extérieur*

*Réverse complément* ← 5 **5'-GTTGTCACCCTGGACCTGGTCG-3'**



>E. coli K-12 MG1655 U00096.3 (1103197 to 1103950 = 754 bp)

**GATGAAACCCGCTTTTTTATTG**ATCGCACACCTGACAGCTGCCTCTAAAATAGAAGCACCAGAAGTACTGACA  
GATGTTGCACTGCTGTGTGTAGTAATAAATCAGCCCTAAATGGGTAAAATATAAACTAATGGATTACATCTGAT  
TTCAATCTAGCCATTACAAATCTTAAATCAAGTGTTAAACATGTA ACTAAATGTA ACTCGTTATATTTAAAATGTT  
AACCTTAAGGTTTTATTAAGTTTAGAAATGATAGAAAAGTTGTACATTTGGTTTTTTATTGCACAATTTTAAAAA  
TCATACAAATGGTGATAACTTACTAATAATGCATATAAAAAATATTTCCGGTGTAGTCCTTTCGTCATGTAAAACG  
TTCTTGTTTTTTCTCCACACCTCCGTGGACAATTTTTTACTGCAAAAAGACGAGGTTTGTACACGGCTTGTGCGCA  
AGACATATCGCAGCAATCAGCGACGGGCAAGAAGAATGACTGTCTGGTGCTTTTTGATAGCGGAAAACGGAGATT  
TAAAAGAAAACAAAATATTTTTTTGCGTAGATAACAGCGTATTTACGTGGGTTTTAATACTTTGGTATGAACTAA  
AAAAGAAAATACAACGCGCGGGTGAGTTATTA AAAATATTTCCGCAGACATACTTTCCATCGTAACGCAGCGTT  
AACAAAATACAGGTTGCGTTAACAACCAAGTTGAAATGATTTAATTTCTTAAATGTA**CGACCAGGTCCAGGGTGA  
CAAC**

**Amorce SENS**

**5'-GATGAAACCCGCTTTTTTATTG-3'**

**Amorce Reverse**

**5'-CGACCAGGTCCAGGGTGACAAC-3'**

3'-GCTGGTCCAGGTCCCCTGTTG-5'

**5'-GTTGTCACCCTGGACCTGGTTCG-3'**

### Amorce SENS

5'-**ctaaggatgatttctggaattc**gatgaaaccccgcttttttattg-3'

pIG57

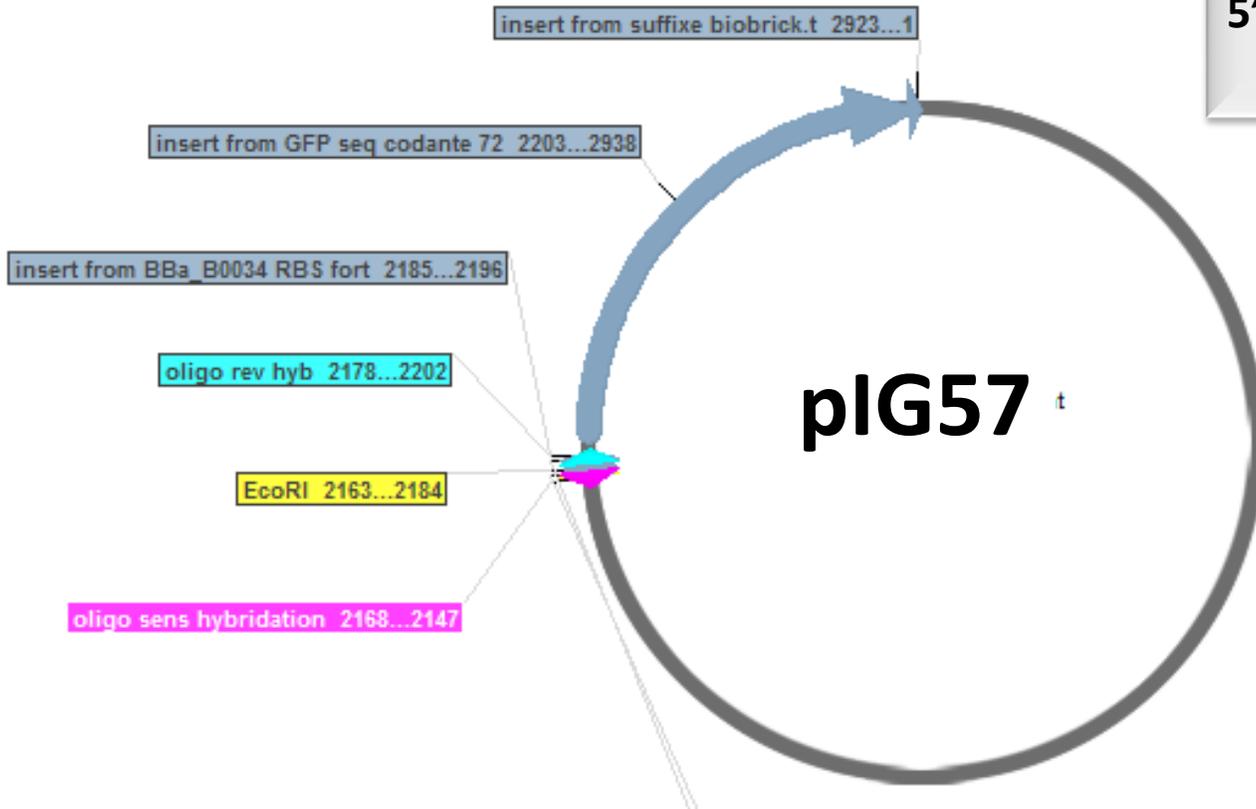
Prom Curli

### Amorce Reverse

5'-**ctagtatttctcctcttttctctaga**GTTGTCACCCTGGACCTGGTCG-3'

pIG57

Prom Curli



- Il est possible de mesurer directement la température de fusion d'un ADN double brin en mesurant l'augmentation de l'absorbance de la solution à 260 nm en fonction de la température.
- Toutefois, on se contente la plupart du temps d'une estimation à partir de la composition de l'oligonucléotide. Si celui-ci a une longueur égale ou inférieure à 20 nt on compte 2°C par couple A:T et 4°C par couple G:C.

- **Oligonucléotide inférieur à 20 nt**

- $(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4 = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$

- **Oligonucléotide supérieur à 20 nt**

- $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] \times (1 + [(N-20)/20]) = T_m \text{ en } ^\circ\text{C}$

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.9.8.html>

Using Serial Cloner, the  $T_m$  is calculated as follows:

- For fragments <14 nt :  $T_m = (A+T)*2+(G+C)*4-16.6*\log_{10}(0.050)+16.6*\log_{10}([Na^+])$
- For fragments >51 nt:  $T_m = 100.5+(41*(G+C)/(A+T+G+C))(820/(A+T+G+C))+16.6*\log_{10}([Na^+])$
- For larger fragments :  $T_m = 81.5+(41*(G+C)/(A+T+G+C))-(500/(A+T+G+C))+16.6*\log_{10}([Na^+])$



---

## Serial Cloner 1.2

User Manual

Part I -Basic functions -

---

## JOUR 3

8h-12h

- Préparation de l'analyse sur gel de la réaction de PCR
- Principe d'extraction de l'ADN plasmidique, kits commerciaux
- Coulage gel d'agarose à la concentration appropriée pour la détection du produit de PCR.
- Coulage gel d'agarose à la concentration appropriée pour l'analyse des plasmides amplifiés in vivo
- Miniprep ADN plasmides amplifiés in vivo
- Scale-up (mini, midi, mega Prep)

## JOUR 3

14h-18h

- Digestion enzymatique de l'ADN des minipreps
- Migration des ADN digérés et non digérés sur gel d'agarose
- Révélation bromure d'éthidium et lecture Bioprofil ou Chemidoc
- Migration des produits de PCR et des contrôles
- Analyse des gels
- Remplir le cahier de laboratoire

## JOUR 4

### 8h-12h

- Principe de clonage, méthode SLIC
- Définition de l'approche expérimentale pour tester la fonctionnalité de la construction commandée au prestataire
- Clonage SLIC: détermination des quantités d'AND insert (produit de PCR) et vecteur (pIG57= pSB1K3-RBS-GFP, KanR) au Nanodrop et sur gel d'agarose, préparation du mix réactionnel
- Mise en culture pour la transformation

### 14h-18h

- Préparation des cellules compétentes, transformation, étalement sur milieu sélectif
- La régulation de l'opéron curli

Digestion pIG57

## Clonage SLIC

One-step sequence- and ligation-independent cloning (SLIC):

pIG57 digéré *EcoRI* (inactiver !)

Produit de PCR sur ADN<sub>g</sub> MC4100

Linearize a vector  
by restriction digestion  
or inverse PCR

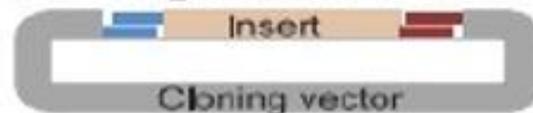


Prepare the insert(s)  
with  $\geq 15$  bp homology  
to the vector ends by PCR



Mix insert(s) with linearized vector

Treat **T4 DNA polymerase** at room temperature  
for **2.5 min** to generate 3' overhangs



Incubate **on ice** for **10 min**

Mix with competent *E. coli* and perform bacterial transformation

# Test de fonctionnalité du pCGS4

## Régulation du promoteur curli

### Propriétés du Promoteur curli

- Est actif à 30°C mais pas à 37°C
- Fonctionne uniquement en présence de l'allèle *ompR234* du gène *ompR*. NM522 possède l'allèle *ompR*, MC4100 *ompR234* possède l'allèle *ompR234* !

## JOUR 5

### 8h-12h

- Mise en culture pour test fonctionnel du promoteur d'intérêt en cinétique
- Prélèvements réguliers pour dosage GFP
- Les gènes rapporteurs GFP et leurs dérivés
- Les fusions de transcription
- Dosage GFP sur boîtes au Chemidoc
- Dosage des prélèvements effectués au cours du matin au fluorimètre Chameleon

### 14h-18h

- Prélèvements et dosages de l'après-midi
- Remplir le cahier de laboratoire
- Analyse de la cinétique d'expression du promoteur curli en fonction de la température (30°C ou 37°C)
- Bilan final